

DOCKET NO.: 264631US0XPCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Harald GROEGER, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/EP03/07248

INTERNATIONAL FILING DATE: July 7, 2003

FOR: TWO-PHASE ALCOHOL DEHYDROGENASE-BASED COUPLED ENZYMATIC  
REACTION SYSTEM

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

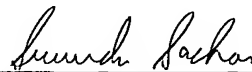
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that  
the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Germany	102 33 107.3	20 July 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the  
International Bureau in PCT Application No. PCT/EP03/07248. Receipt of the certified  
copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been  
acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

**Best Available Copy**

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 18 SEP 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 33 107.3

**Anmeldetag:** 20. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem

**IPC:** C 12 N, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

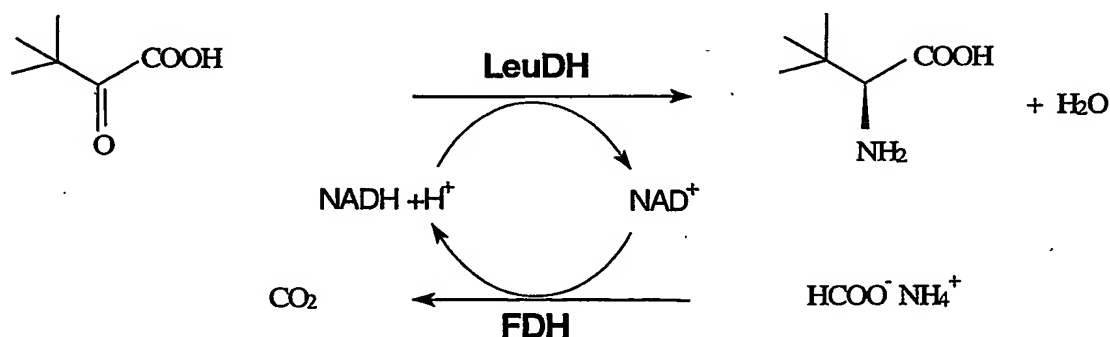
München, den 11. Juni 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

## Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem

Die vorliegende Erfindung betrifft ein gekoppeltes enzymatisch arbeitendes Reaktionssystem, welches sich dadurch auszeichnet, dass es in einem zwei Phasen aufweisenden Lösungsmittelgemisch durchgeführt wird. Insbesondere richtet sich die Erfindung auf ein Reaktionssystem umfassend eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung und eine enzymatische Cofaktorregeneration im selben System.

Die Gewinnung optisch aktiver organischer Verbindungen, z.B. Alkohole und Aminosäuren, auf biokatalytischem Wege gewinnt zunehmend an Bedeutung. Als ein Weg zur großtechnischen Synthese dieser Verbindungen hat sich der gekoppelte Einsatz zweier Dehydrogenasen unter Cofaktorregenerierung gezeigt (DE19753350).

Schema 1:



*In situ* Regeneration von NADH mit der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase bei der reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat zu L-tert-Leucin (Bommarius et al. Tetrahedron Asymmetry 1995, 6, 2851-2888).

Die im wässrigen Medium effizient eingesetzten Biokatalysatoren weisen neben ihrer katalytischen Eigenschaft und Effizienz zudem den Vorteil auf, dass im Gegensatz zu einer Vielzahl an synthetischen metallhaltigen

Katalysatoren auf den Einsatz metallhaltiger, insbesondere schwermetallhaltiger und somit toxischer Einsatzstoffe verzichtet werden kann. Auch kann auf den Einsatz von teuren und zudem gefährlichen Reduktionsmittel wie  
5 beispielsweise Boran bei der asymmetrischen Reduktion verzichtet werden.

Allerdings treten Schwierigkeiten bei der Umsetzung von Substraten auf, die schlecht wasserlöslich sind. Ähnliche Schwierigkeiten liegen bei schlecht wasserlöslichen  
10 Produkten vor. Dies ist insbesondere bei der Herstellung von optisch aktiven Alkoholen gemäß obigem Konzept der Fall, da die als Ausgangsverbindungen benötigten Ketone eine deutlich geringere Löslichkeit aufweisen als die in Schema 1 eingesetzten  $\alpha$ -Ketosäuren.

15 Eine prinzipiell denkbare Lösung wäre die Durchführung der biokatalytischen Reduktion in einem polaren organischen Solvens bzw. einer wässrigen Lösung daraus. Hierbei sollten sowohl Enzyme als auch Substrat und ggf. Produkt löslich sein. Ein genereller Nachteil einer direkten Gegenwart  
20 eines organischen Solvens stellt allerdings die im Allgemeinen auftretende erhebliche Verminderung der Enzymaktivität unter diesen Bedingungen dar (siehe z.B. Anderson et al., *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 57, 79-86). Gerade die Formiatdehydrogenase und insbesondere die FDH  
25 aus *Candida boidinii* bzw. eine daraus resultierende Mutante als einziges bislang im technischen Maßstab eingesetztes und in kommerziellen Mengen zugängliches NADH-Regenerierungsenzym weist bedauerlicherweise eine hohe Empfindlichkeit gegenüber organischen Solventien auf  
30 (EP1211316). Dieses zeigt sich auch in den Vergleichsbeispielen 1 bis 8 unter Verwendung von DMSO, Sulfolan, MTBE, Aceton, Isopropanol und Ethanol etc. als organischer Solvenskomponente bei Zusatzmengen von je 10% (siehe Fig. 1).

35 Zur Lösung dieses Problems betreffend einer Stabilisierung der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* in Gegenwart

organischer Solventien sind verschiedene Ansätze bekannt, z.B. die Durchführung von Reaktionen durch zusätzlichen Einsatz von Tensiden als oberflächenaktive Stoffe.

Nachteilig zeigt sich dabei aber die etwa um den Faktor 40

5 (!) verminderte Reaktionsgeschwindigkeit sowie die auftretende Inhibierung der Formiatdehydrogenase (B. Orlich et al., *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 65, 357-362.). Die Autoren bemerken zudem, dass aufgrund der niedrigen Stabilität der Alkoholdehydrogenase ein Reduktionsprozeß  
10 unter diesen Bedingungen einer Mikroemulsion nicht ökonomisch ist. Gleiches gilt prinzipiell auch für die in der EP340744 dargestellte Methode, bei der lyotrope Mesophasen als Reaktionsort in Gegenwart von einer wässrigen und/oder organischen Phase gewählt wurden.

15 Eine weitere prinzipielle Möglichkeit der Durchführung von biokatalytischen Reaktionen besteht in der Anwendung immobilisierter Enzyme im organischen Solvens oder die Verwendung von Enzymen in einer homogenen Lösung, bestehend aus Wasser und einem wassermischbaren organischen Solvens.

20 Allerdings sind die Erfolge bei diesen Techniken bei den es zu einem direkten Kontakt von organischem Solvens und Enzym kommt, auf wenige Enzymklassen, insbesondere Hydrolasen, begrenzt. So wird in DE4436149 bemerkt, dass die „direkte Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (wassermischbar  
5 oder nicht wassermischbar) nur von wenigen Enzymen vertragen wird, die zur Klasse der Hydrolasen gehören.“

Wenige weitere Beispiele aus anderen Enzymklassen sind zwar in der Zwischenzeit bekannt (so u.a. Oxynitrilasen und eine FDH aus Hefe), die in DE4436149 gemachte Feststellung  
30 besitzt aber für die Mehrzahl der Enzyme nach wie vor Gültigkeit. Darüberhinaus ist eine effiziente Immobilisierung der FDH aus *Candida boidinii* nicht bekannt. Zudem ist die Immobilisierung selbst mit zusätzlichen Kosten durch den Immobilisierungsschritt sowie die  
35 Immobilisierungsmaterialien verbunden.

Technisch wurden deshalb Verfahren entwickelt, die die Gegenwart organischer Lösungsmittel aufgrund der Gefahr der Desaktivierung bzw. Denaturierung der Enzyme vermeiden. So beschreibt DE4436149 ein Verfahren, bei dem das Produkt aus der Reaktionslösung durch eine produktdurchlässige, insbesondere hydrophobe Membran in ein organisches Lösungsmittel extrahiert wird. Verglichen mit einem Standardverfahren in einem Rührkesselreaktor ist dieses Verfahren allerdings technisch deutlich aufwendiger, zudem sind auch die benötigten organischen Membranen ein zusätzlicher Kostenfaktor. Darüber hinaus ist diese Methode nur für kontinuierliche Prozesse geeignet. Weiterhin ist es ein Nachteil, dass die erzielbaren Raumzeitausbeuten bei dieser Verfahrensweise vergleichsweise gering sind. Beispielsweise wird bei der Reduktion von Acetophenon nur eine Raumzeitausbeute von 88 g/(L\*d) erreicht (S. Rissom et al., *Tetrahedron: Asymmetry* 1999, 10, 923-928). Dabei ist zu beachten, dass Acetophenon selbst noch ein relativ gut wasserlösliches Keton darstellt und die meisten analogen substituierten Acetophenonketone und verwandte Ketone weitaus niedrigere Löslichkeiten besitzen, so dass die Raumzeitausbeuten für typische hydrophobe Ketone noch deutlich niedriger liegen sollten. Trotz dieser erheblichen Nachteile gilt dieses Verfahren als bislang bevorzugte Methode für die asymmetrische biokatalytische Reduktion schwer löslicher Ketone unter Verwendung isolierter Enzyme (siehe dazu auch: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000, S. 103-106).

In der Doktorarbeit von Tien Van Nguyen (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 1998) wird u.a. ein Reaktionssystem aus Alkoholdehydrogenasen, NADH, Formiatdehydrogenase im Lösungsmittelsystem Heptan/Wasser zur Reduktion von p-Chloracetophenon beschrieben. Dabei wurde das Substrat jeweils in Konzentrationen von 10 mmol pro L Gesamtvolumen der Lösungsmittel (= Summe der Volumina

an organischem Solvens und wässrigem Teil) eingesetzt. Laut den Ergebnissen können nur bis zu diesen Substratkonzentrationen annehmbare Ausbeuten an Produkt erreicht werden. Eine solche Substratkonzentration von 10 mM oder darunter ist für eine technische Anwendung jedoch bei weitem nicht ausreichend. Die daraus resultierenden Raumzeitausbeuten wären für eine technische Anwendung viel zu gering.

Diese Einschätzung von T. N. Nguyen bezüglich der Probleme bei höheren Substratkonzentrationen findet sich übrigens auch an zahlreichen anderen Literaturstellen bestätigt, was zu den obig genannten Lösungsansätzen, beispielsweise durch Einsatz von Membranen, führte.

Zudem weisen Anderson et al. im Rahmen seiner Arbeiten zur biokatalytischen Herstellung eines Pharmawirkstoffs durch Reduktion eines Ketons auf einen (generell zu erwartenden) weiteren Nachteil bei höheren Substratkonzentrationen hin, nämlich Toxizitätseffekten, die gerade bei den hydrophoben Alkoholen verbreitet auftreten. In dieser Arbeit (B. A. Anderson et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12358-12359) wird festgestellt, dass - im Gegensatz zu Aktivitätstests - Reaktionen im präparativen Maßstab, also unter „annehmbaren Substratkonzentrationen“, sich problematisch zeigen durch erhebliche Toxizitätseffekte. Diese wurden in diesem Fall selbst mit in Zellen „immobilisierten“ Enzymen festgestellt und zudem in wässriger Lösung beobachtet. Entsprechende Inhibierungen bei höherer Substratkonzentration sollten erwartungsgemäß bei der Verwendung „freier“, isolierter Enzyme und in Gegenwart von organischen Solventien demzufolge noch verstärkt auftreten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass somit momentan kein Verfahren bekannt ist, welches die oben aufgeführten Nachteile umgehen hilft und die enzymatische Darstellung schlecht wasserlöslicher Substrate im technischen Maßstab gestattet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, eine Möglichkeit anzugeben, wie insbesondere schlecht wasserlösliche organische Verbindungen einer gekoppelten cofaktorabhängigen enzymatischen Umsetzung in derart  
5 ausreichendem Maße zugänglich gemacht werden können, dass eine Anwendung der Umsetzung im technischen Maßstab unter ökonomisch und ökologisch vorteilhaften Voraussetzungen erfolgen kann. Insbesondere war eine Aufgabe, dass ein solches Verfahren sich zur Reduktion von schlecht  
10 wasserlöslichen Ketonen eignen sollte.

Diese Aufgabe wird anspruchsgemäß gelöst. Ansprüche 1 bis 10 richten sich auf ein erfindungsgemäß operierendes Reaktionssystem. Anspruch 11 schützt eine Vorrichtung. Anspruch 12 betrifft ein erfindungsgemäß arbeitendes  
15 Verfahren, wohingegen die Ansprüche 13 und 14 auf bevorzugte Verwendungen des erfindungsgemäßen Reaktionssystems gerichtet sind.

Dadurch, dass man ein gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine cofaktorabhängige  
20 enzymatische Transformation einer organischen Verbindung mit einer Alkoholdehydrogenase und eine enzymatische Regeneration des Cofaktors in einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem, bei dem eine wässrige Phase mit einer flüssigen organischen Phase in Kontakt steht und die  
25 organische Verbindung in einer Konzentration von >25 mM pro L Gesamtvolumen der Lösungsmittel (= Summe der Volumina an organischem Solvens und wässrigem Teil) vorliegt, bereitstellt, gelangt man insbesondere überraschend, keinesfalls vorhersehbar und erfindungsgemäß besonders  
30 vorteilhaft zur Lösung der gestellten Aufgabe. Entgegen der aus dem Stand der Technik ableitbaren Meinung ist es überraschenderweise möglich, trotz Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels das gekoppelte enzymatische Reaktionssystem ohne lösungsmittelbedingten



Aktivitätsverlust eines der Enzyme in für den technischen Maßstab ausreichenden Konzentrationen arbeiten zu lassen.

Das im Reaktionssystem eingesetzte organische Lösungsmittel soll mit der vorhandenen wässrigen Phase zwei getrennte  
5 Phasen bilden. Im Rahmen dieser Vorgabe ist der Fachmann prinzipiell frei in der Wahl des organischen Lösungsmittels. Es hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, wenn als organische Phase ein Lösungsmittel gewählt wird, welches eine möglichst geringe Löslichkeit in  
10 Wasser besitzt ( $\log P$ -Wert  $\geq 3$ , vorzugsweise  $\geq 3,1$ , mehr bevorzugt  $\geq 3,2$  etc.). Da das organische Lösungsmittel gleichzeitig auch das wenig wasserlösliche Edukt aufnehmen soll, ist darüber hinaus auch wichtig, dass es eine möglichst hohe Löslichkeit für die eingesetzten organischen  
15 Verbindungen besitzt.

Derartige organische Lösungsmittel, welche sich bevorzugt im Reaktionssystem einsetzen lassen, sind unter den gegebenen Reaktionsbedingungen flüssige aromatische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe. Insbesondere Toluol,  
20 Xylole, Benzol, n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, n-Octan, Isooctan, Cyclohexan, Methylcyclohexan, sowie deren verzweigt-kettige Isomere sind ganz besonders bevorzugt. Auch halogenierte Kohlenwasserstoffe können eingesetzt werden ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Chlorbenzol etc.).

25 Das Mengenverhältnis von organischem Lösungsmittel zu wässrigem Teil kann beliebig gewählt werden. Das organische Lösungsmittel wird bevorzugt in einer Menge bezogen auf das Gesamtvolumen der Lösungsmittel (= Summe der Volumina an organischem Solvens und wässrigem Teil) von 5-80 Vol.-%, vorzugsweise 10-60 Vol.-%, besonders bevorzugt von 20-50  
30 Vol.-% eingesetzt.

Entgegen den im Stand der Technik vorgeschlagenem Ansatz, Tenside zur enzymatischen Reaktionsmischung zuzugeben, um die enzymatische Transformation zu beschleunigen, in dem  
35 Phasenübergänge bei der Reaktion minimiert werden, belegt

die vorliegende Erfindung, dass der Einsatz eines erfindungsgemäßen Reaktionssystems gerade dann besonders erfolgreich verläuft, wenn das System keine Tenside enthält.

5 Unter Tensiden werden in diesem Zusammenhang alle diejenigen Substanzen verstanden, die befähigt sind, micellare Strukturen aufzubauen bzw. die Oberflächenspannung an flüssig-flüssig Phasengrenzen zu erniedrigen.

10 Wie schon angedeutet sollte die Konzentration, mit der die Substrate im Reaktionssystem eingesetzt werden, so bemessen sein, dass eine unter ökonomischen Gesichtspunkten vorteilhafte Umsetzung erfolgen kann. Die organische Verbindung sollte daher vor Reaktionsstart

15 vorteilhafterweise in einer Konzentration von >25 mM, vorzugsweise >100 mM, besonders bevorzugt >200 mM und ganz besonderes bevorzugt >500 mM pro L Gesamtvolumen der Lösungsmittel (= Summe der Volumina an organischem Solvens und wässrigem Teil) vorliegen. Eine Obergrenze für die

20 Konzentration bildet naturgemäß die Gewährleistung für die Durchführbarkeit der Reaktion, insbesondere sollte Rührbarkeit der Reaktionsmischung in jedem Fall gegeben sein. Man kann jedoch bevorzugt auch über der Sättigungsgrenze für das Substrat bzw. das Produkt  
5 arbeiten.

Cofaktoren sind dem Fachmann geläufig (Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Ed.: K. Drauz, H. Waldmann, 1995, Vol I, S.14, VCH). Die hier zu betrachtenden

30 Alkoholdehydrogenasen benutzen vorzugsweise für die zu katalysierenden Redoxreaktionen als Cofaktoren Moleküle wie z.B. NAD, NADH, NADPH oder NADP als Wasserstoffüberträger.

Das genannte gekoppelte enzymatische Reaktionssystem kann erfindungsgemäß in allen dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommende enzymatische Reaktionen, bei denen

35 Ketogruppen in Alkoholgruppen umgesetzt werden, eingesetzt

werden. Bevorzugt sind wie gesagt jedoch Oxidoreductase-Reaktionen. Die erfindungsgemäß eingesetzten Alkoholdehydrogenasen stammen dabei vorzugsweise aus den Organismen *Rhodococcus erythropolis* (S-ADH) oder  
5 *Lactobacillus kefir* (R-ADH) (Dissertation Nguyen, Aachen, 1998).

Das Enzym, das den eingesetzten Cofaktor regeneriert, ist prinzipiell vom eingesetzten Cofaktor andererseits jedoch auch vom zu oxidierenden bzw. zu reduzierenden Cosubstrat abhängig. In Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Ed.: K. Drauz, H. Waldmann, 1995, Vol I, VCH, S.721 sind einige  
10 Enzyme zur Regeneration von NAD(P) genannt. Kommerziell von Interesse und auch im großen Maßstab erhältlich sowie derzeit zur Synthese von Aminosäuren eingesetzt wird aus  
15 diesen Gründen vorteilhafterweise die sogenannte Formiatdehydrogenase (FDH, Schema 1). Sie ist daher zur Regeneration des Cofaktors bevorzugt zu verwenden. Ganz besonders bevorzugt stammt die FDH aus dem Organismus *Candida boidinii*. Es können auch weiterentwickelte Mutanten  
20 derselben eingesetzt werden (DE19753350). Besonders überraschend ist dabei, dass die Formiatdehydrogenase aus *C. boidinii* trotz der beobachteten hohen Instabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln (siehe dazu  
5 Vergleichsbeispiele im experimentellen Teil) unter diesen Bedingungen effizient eingesetzt werden kann. Ebenfalls zur Regeneration von NADH eingesetzt werden kann einen sogenannte NADH-Oxidase aus z.B. *Lactobacillus kefir* oder *Lactobacillus brevis*.

In einer nächsten Ausgestaltung bezieht sich die  
30 vorliegende Erfindung auf eine Vorrichtung zur Transformation von organischen Verbindungen, welche das erfindungsgemäße Reaktionssystem aufweist. Vorteilhaft einzusetzende Vorrichtungen sind beispielsweise der Rührkessel oder Rührkesselkaskaden, oder Membranreaktoren,  
35 die sowohl im batch-Betrieb als auch kontinuierlich

betrieben werden können.

Im Rahmen der Erfindung wird unter Membranreaktor jedwedes Reaktionsgefäß verstanden, bei dem der Katalysator in einem Reaktor eingeschlossen wird, während niedermolekulare

5 Stoffe dem Reaktor zugeführt werden oder ihn verlassen können. Dabei kann die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert werden oder außerhalb in einem separaten Filtrationsmodul eingebaut sein, bei der die Reaktionslösung kontinuierlich oder intermittierend durch  
10 das Filtrationsmodul strömt und das Retentat in den Reaktor zurückgeführt wird. Geeignete Ausführungsformen sind u.a. in der WO98/22415 und in Wandrey et al. in Jahrbuch 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI S. 151ff.; Wandrey et al. in Applied Homogeneous Catalysis with  
15 Organometallic Compounds, Vol. 2, VCH 1996, S.832 ff.; Kragl et al., Angew. Chem. 1996, 6, 684f. beschrieben. Die in dieser Apparatur neben der batch und semikontinuierlichen Fahrweise mögliche kontinuierliche Fahrweise kann dabei wie gewünscht im Cross-Flow-  
20 Filtrationsmodus (Fig. 3) oder als Dead-End-Filtration (Fig. 2) durchgeführt werden. Beide Verfahrensvarianten sind prinzipiell im Stand der Technik beschrieben (Engineering Processes for Bioseparations, Ed.: L.R. Weatherley, Heinemann, 1994, 135-165; Wandrey et al.,  
25 Tetrahedron Asymmetry 1999, 10, 923-928).

Eine nächste Ausgestaltung der Erfindung beschäftigt sich mit einem Verfahren zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen unter Anwendung des erfindungsgemäßen Reaktionssystems. Vorzugsweise handelt es  
30 sich bei dem Verfahren um die Herstellung einer enantiomer angereicherten organischen Verbindung, vorzugsweise einem chiralen Alkohol. Die Ausgestaltung des Verfahrens kann anhand des beschriebenen Reaktionssystems und den nachfolgend dargelegten Beispielen nach dem Belieben des  
35 Fachmanns ausgeführt werden. Es werden unter den gegebenen

Randbedingungen die sonst für die enzymatische Umsetzung bekannten Bedingungen entsprechend eingestellt.

Ein nächster Aspekt der Erfindung beschäftigt sich denn auch mit der Verwendung des erfindungsgemäßen

- 5 Reaktionssystems in einem Verfahren zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen oder zur Diagnose bzw. Analyse organischer Verbindungen, vorzugsweise von Alkoholen. Weiter vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Reaktionssystem wie gesagt in einem Verfahren zur
- 10 Herstellung enantiomer angereicherter organischer Verbindungen, vorzugsweise von Alkoholen eingesetzt.

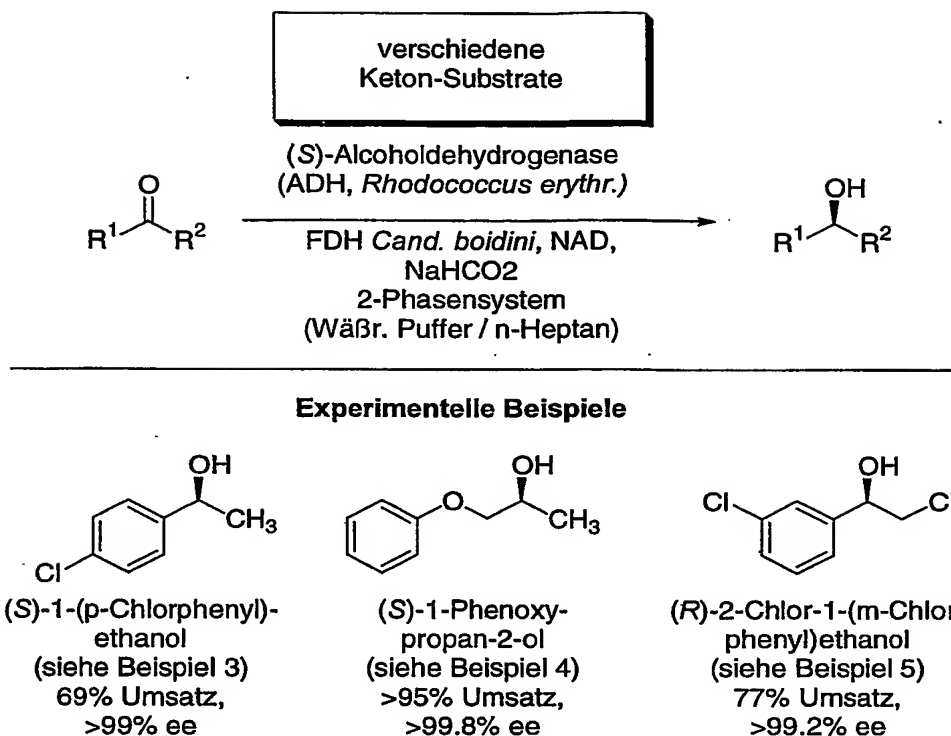
Unter gekoppeltem enzymatischen System wird erfindungsgemäß verstanden, dass eine enzymatische Transformation einer organischen Verbindung unter Verbrauch eines Cofaktors

15 abläuft und der Cofaktor in situ durch ein zweites enzymatisches System regeneriert wird. Im Ergebnis führt dies zu einer Verminderung des Einsatzes teurer Cofaktoren.

Am Beispiel des Systems Alkoholdehydrogenase/NADH/FDH/Ameisensäure kann die vorliegende Erfindung erläutert werden. Die asymmetrische Synthese von alkoholen wurde

20 ausgehend vom entsprechenden Keton mittels dieses Reaktionssystems durchgeführt.

Schema 2:



Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgte durch Extraktion mit MtBE und Eindampfen der organischen Phase.

- 5 Den entsprechenden Alkohol erhielt man so mit einem Umsatz von 69% und einer Enantioselektivität von 99% in einer apparativ sehr einfachen Art und Weise (Beispiel 3).

Hervorragende Enantioselektivitäten werden aber auch beim Einsatz anderer Ketone als Ausgangsmaterialien erhalten. So

10 resultiert die Reduktion von Phenoxyaceton unter diesen Reaktionsbedingungen zu einem enantiomerenreinen Produkt quantitativ in >99.8% ee (Beispiel 4).

Weiterhin eignet sich das erfindungsgemäße Reaktionssystem aber auch für sterisch anspruchsvolle Ketone. Dies sei

15 exemplarisch am Beispiel des  $\alpha$ ,m-Dichloracetophenons dokumentiert. Dieses Keton ist sowohl an der Methylgruppe als auch am aromatischen Ring mit einem Chloratom substituiert. Die biokatalytische Reduktion im 2-

Phasensystem ergibt hier das gewünschte Produkt 2-Chlor-1-(m-Chlorphenyl)-ethanol erneut in hervorragender Enantioselektivität von >99.2% (Beispiel 5). Der Umsatz liegt hier bei 77%.

- 5 Die entsprechenden Versuche der experimentellen Beispiele 3-5 sind in Schema 2 dargestellt.

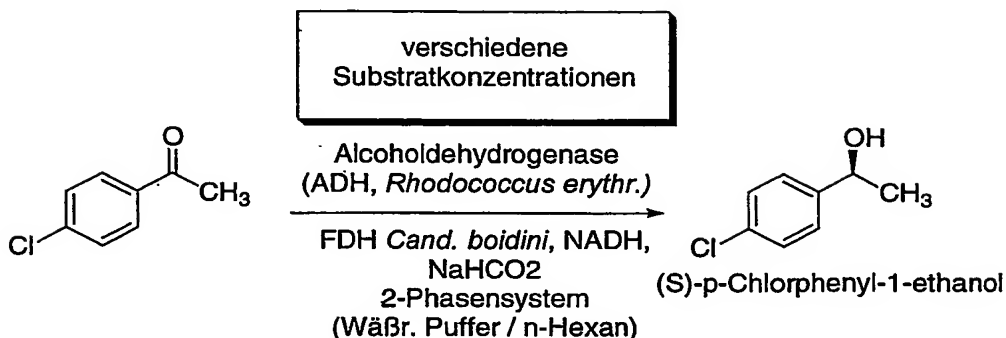
10 Diese hohen Umsätze sowie Enantioselektivitäten sind nicht zuletzt deshalb überraschend, weil durch die Anwesenheit von organischen Solventien oft nicht nur eine Verminderung der Enzym-Aktivität (einhergehend mit einem niedrigen Umsatz) sondern auch eine Veränderung der Enzymeigenschaften hinsichtlich Stereospezifität (einhergehend mit einer Verminderung der Enantioselektivität) zu beobachten ist.

- 15 Besonders überraschend aber zeigten sich in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Versuche bei erhöhten Substratkonzentrationen. Diese Versuche wurden mit p-Chloracetophenon als Modellsubstrat durchgeführt. Wird in obigem Versuch bei einer Substratkonzentration von 10 mM  
20 (diese Substratkonzentration entspricht der Konzentration bei den Versuchen aus dem Stand der Technik) ein Umsatz von 69% erzielt (Beispiel 3), so konnte dieser Umsatz - entgegen der verbreiteten Ansicht, dass bei erhöhten Substratkonzentrationen aufgrund von Inhibierungen etc. nur  
25 verminderten Ausbeuten erzielt werden können -, bei diesem Reaktionstyp nun ab einer Konzentration bezogen auf das Gesamtvolumen an Lösungsmitteln (= organisches und wässriges Lösungsmittel) von >25 mM noch gesteigert und  
30 höhere Umsätze von 75% (bei 40mM) und 74% (bei 100 mM) erzielt werden (Beispiele 6, 7).

Besonders erwähnenswert ist hierbei der hohe Umsatz bei einer Konzentration 100 mM (Beispiel 7). Die Versuche zur enzymatischen Reduktion bei unterschiedlichen

Substratkonzentrationen (Beispiele 3,6,7) sind in Schema 3 und Fig. 4 graphisch dargestellt.

Schema 3:



5

In weiteren Versuchen wurde die Langzeitstabilität der FDH aus *C. boidinii* in verschiedenen Lösungsmittelsystemen untersucht. Im Gegensatz zu den meisten organischen Solventien (siehe Vergleichsbeispiele), die zu einer schnellen Desaktivierung der FDH führen, wurden im Zweiphasensystem, insbesondere bei Verwendung obiger erwähnter Kohlenwasserstoffkomponenten, hervorragende Stabilitätseigenschaften der Formiatdehydrogenase, insbesondere der FDH aus *C. boidinii*, auch nach mehreren Tagen noch beobachtet. Während beispielsweise in Gegenwart von Aceton bzw. DMSO die Enzymaktivität innerhalb von 24 Stunden um 35 bzw. 66% abnimmt, sind in Gegenwart von 20 Vol.-% Hexan noch 90% Enzymaktivität selbst nach 3 Tagen zu verzeichnen. Die Ergebnisse mit n-Hexan finden sich in Fig. 1 graphisch dargestellt und Tabelle 3 wieder. Die Vergleichsbeispiele mit anderen organischen Solventien sind ebenfalls in Fig. 1 aufgeführt.

Ein Hauptvorteil dieses Verfahrens besteht in der Einfachheit des Prozesses. So sind keine aufwendigen Verfahrensschritte enthalten, und das Verfahren kann sowohl in Batchreaktoren als auch kontinuierlich durchgeführt

25



werden. Ebenso werden im Gegensatz zu früheren Verfahren keine speziellen Membranen, die das wässrige Medium vom organischen Medium trennen, benötigt. Auch die in einigen bisherigen Prozessen benötigten Tensid-Zusätze entfallen  
5 bei diesem Verfahren. Ein weiterer Hauptvorteil liegt in der erstmaligen Möglichkeit, die enzymatische Herstellung von optisch aktiven Alkoholen in technisch sinnvollen Substratkonzentrationen von >25 mM zu gestalten. Diese Vorteile waren aus dem Stande der Technik in naheliegender  
10 Weise so nicht herleitbar.

Enantiomerenangereichert oder enantiomer angereichert bezeichnet die Tatsache, dass eine optische Antipode im Gemisch mit ihrer anderen zu >50% vorhanden ist.

Die dargestellten Strukturen beziehen sich bei Vorliegen  
15 eines Stereozentrums auf beide möglichen Enantiomere und bei Vorliegen von mehr als einem Stereozentrum im Molekül auf alle möglichen Diastereomere und bezüglich eines Diastereomers auf die darunter fallenden möglichen zwei Enantiomere der in Frage stehenden Verbindung.

20 Der Organismus *C. boidinii* ist unter der Nummer ATCC 32195 bei der American Type Culture Collection hinterlegt und öffentlich zugänglich.

Die in dieser Schrift genannten Dokumente des Standes der Technik gelten als von der Offenbarung mitumfasst.

## Beschreibungen der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt einen Membranreaktor mit Dead-End-Filtration. Das Substrat 1 wird über eine Pumpe 2 in den Reaktorraum 3 überführt, der eine Membran 5 aufweist. Im  
5 rührerbetriebenen Reaktorraum befinden sich neben dem Lösungsmittel der Katalysator 4, das Produkt 6 und nicht umgesetztes Substrat 1. Über die Membran 5 wird hauptsächlich niedermolekulares 6 abfiltriert.

Fig. 2 zeigt einen Membranreaktor mit Cross-Flow-Filtration. Das Substrat 7 wird hier über die Pumpe 8 in  
10 den gerührten Reaktorraum überführt, in dem sich auch Lösungsmittel, Katalysator 9 und Produkt 14 befindet. Über die Pumpe 16 wird ein Lösungsmittelfluß eingestellt, der über einen ggf. vorhandenen Wärmetauscher 12 in die Cross-  
15 Flow-Filtrationszelle 15 führt. Hier wird das niedermolekulare Produkt 14 über die Membran 13 abgetrennt. Hochmolekularer Katalysator 9 wird anschließend mit dem Lösungsmittelfluß ggf. wieder über einen Wärmetauscher 12 ggf. über das Ventil 11 zurück in den Reaktor 10 geleitet.

**Experimenteller Teil:**

**Beispiel 1** (Vergleichsbeispiele der FDH-Aktivitäten unter Verwendung einer FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A))

- 5 Es werden 2,72 g (0,8 mol/L) Natriumformiat und 1,14 g (0,1 mol/L) Di-Kalium-Hydrogen-Phosphat-Tri-Hydrat eingewogen und in 40 mL VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Mit Ammoniak-Lösung (25%) und Ameisensäure (100%), bzw. entsprechenden Verdünnungen, wird der pH-Wert der Lösung auf 8,2 gestellt. Dann wird die
- 10 Lösung in einen 50 mL-Meßkolben überführt und mit VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Separat dazu werden 71,7 mg (4 mmol/L) NAD<sup>+</sup>-Tri-Hydrat abgewogen und in ca. 20 mL VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Mit Ammoniak-Lösung (25%) und Ameisensäure (100%), bzw. entsprechenden Verdünnungen, wird der pH-Wert der Lösung
- 15 auf 8,2 gestellt. Dann wird die Lösung in einen 25 mL-Meßkolben überführt und mit VE-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend werden jeweils 500 µL der Substratlösung sowie der NADH-Lösung in der zur Messung verwendeten 1 cm-Küvette gemischt. Nach Zugabe von 10 µL der Enzymlösung, wobei als
- 20 Lösungsmittel eine 10%-ige Lösung eines organischen Solvens (siehe Tabelle) in Wasser zum Einsatz kommt, wird kurz geschüttelt, die Küvette ins Photometer gestellt und die Datenaufnahme gestartet. Die Enzymlösung wird erst direkt vor Meßbeginn zugegeben. Die Aktivitäten der FDH aus *C.*
- 25 *boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A) werden nach bestimmten Zeitabschnitten durch den photometrischen Nachweis der Reaktion NAD<sup>+</sup> zu NADH bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Temperatur von 30° C, einer Wellenlänge von 340 nm und mit einer Meßzeit von 15 min. Die Ergebnisse
- 30 sind anbei in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 1.** Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii*  
(Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von  
Solvens und Zeit

Zeit	Butanol	MEK	DMSO	THF	Sulfolan	Aceto- nitril
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,5262	0,0058	0,7965	0,8492	0,0028	0,7961
0,042	0,0006	0,0011	0,7880	0,4357	0,0003	0,4494
0,125			0,7794	0,0414		0,0840
1,097			0,2669			0,0008
2,035			0,2331			
2,896			0,2201			
5,927			0,1763			
7,885			0,1404			
9,948			0,1205			
13,073			0,0915			
14,892			0,0717			
16,875			0,0540			
19,938			0,0355			

**Tab. 2.** Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii*  
(Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von  
Solvens und Zeit

Zeit	Aceton	Ethanol
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,8355	0,8491
0,042	0,7402	0,7689
0,750	0,5893	0,6367
1,000	0,5426	0,5933
1,875	0,3484	0,4687
2,760	0,2691	0,3510
3,781	0,2004	0,2814
4,646	0,1614	0,2240
5,875	0,1325	0,1736
6,778	0,0987	0,1486
7,792	0,0794	0,1277
8,729	0,0610	0,0998
11,750	0,0333	0,0536
13,726		0,0421

**Beispiel 2** (Messung der FDH-Aktivitäten)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte gemäß der Vorschrift in Beispiel 1, wobei als organische Solvenskomponente Hexan verwendet wurde. Die Ergebnisse sind anbei in Tabelle 3 dargestellt.

**Tab. 3.** Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von Hexan und Zeit

Zeit	Hexan (10%)	Hexan (20%)
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,8364	1,0280
0,042	0,9572	0,9952
0,177	0,8223	1,1408
0,899	0,7892	0,9311
2,000	0,6242	0,9467
2,878	0,7654	0,9280

**Beispiel 3** (Umsetzung mit p-Chloracetophenon)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus p-Chloracetophenon (78.4 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 10 mL n-Heptan und 40 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der  
5 Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante: C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet  
10 man via Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität  
15 (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 69%

Enantioselektivität: >99% ee

**Beispiel 4** (Umsetzung mit Phenoxyaceton)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus Phenoxyaceton (76.0 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 10 mL *n*-Heptan und 40 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante: C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: >95%

Enantioselektivität: >99.8% ee

**Beispiel 5** (Umsetzung mit 2,3'-Dichloracetophenon)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus 2,3'-Dichloracetophenon (102.7 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 10 mL *n*-Heptan und 40 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante: C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch <sup>1</sup>H-NMR- (durch<sup>1</sup>H-NMR- <sup>1</sup>H-NMR-



spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 77%

Enantioselektivität: >99.2% ee

5

**Beispiel 6** (Umsetzung mit p-Chloracetophenon bei 40 mM)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus p-Chloracetophenon (78.4 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 2.5 mL n-Heptan und 10 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante: C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 75%

**Beispiel 7** (Umsetzung mit p-Chloracetophenon bei 100 mM)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus p-Chloracetophenon (78.4 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 1 mL n-Heptan und 4 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante: C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet

man *via* Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch  $^1\text{H}$ -NMR-  
5 spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 74%

## Patentansprüche:

1. Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung mit einer  
5 Alkoholdehydrogenase und eine enzymatische Regeneration des Cofaktors in einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem, bei dem eine wässrige Phase mit einer flüssigen organischen Phase in Kontakt steht und die organische Verbindung in einer Konzentration von  
10 >25 mM pro L Gesamtvolumen der Lösungsmittel vorliegt.
2. Reaktionssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das eingesetzte organische Lösungsmittel eine  
15 möglichst geringe Löslichkeit in Wasser und eine möglichst hohe Löslichkeit für die eingesetzten organischen Verbindungen besitzt.
3. Reaktionssystem nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als organisches Lösungsmittel unter den  
20 Reaktionsbedingungen flüssige aromatische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe eingesetzt werden.
4. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass  
25 das organische Lösungsmittel in einer Menge von 5 - 80 Vol.-% in Bezug auf das Gesamtvolumen der Lösungsmittel vorhanden ist.
5. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
30 dadurch gekennzeichnet, dass das System keine Tenside enthält.
6. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass die organische Verbindung vor Reaktionsstart in einer Konzentration von >100 mM pro L Gesamtvolumen der Lösungsmittel vorliegt.

- 5 7. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Cofaktor NADH oder NADPH eingesetzt wird.

- 10 8. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man als Enzym für die Transformation der organischen Verbindung eine Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* einsetzt.

- 15 9. Reaktionssystem nach Anspruch einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Enzym für die Transformation der organischen Verbindung eine Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* einsetzt.

- 25 10. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Regeneration des Cofaktors durch eine Formiatdehydrogenase, vorzugsweise die aus *Candida boidinii* oder deren Mutanten, erfolgt.

11. Vorrichtung zur Transformation von organischen Verbindungen aufweisend ein Reaktionssystem nach Anspruch 1.

- 30 12. Verfahren zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen unter Anwendung des Reaktionssystems nach Anspruch 1.

13. Verwendung des Reaktionssystems nach Anspruch 1 zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen oder zur Diagnose bzw. Analyse von vorzugsweise Alkoholen.
- 5 14. Verwendung nach Anspruch 13 in einem Verfahren zur Herstellung enantiomer angereicherter organischer Verbindungen, vorzugsweise Alkoholen.

## Zusammenfassung:

Das vorliegende Verfahren betrifft ein gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem, welches in einem Zweiphasensystem aus organischer Phase und wässriger Phase durchgeföhrt wird. Das System arbeitet mit cofaktorabhängigen Enzymen, wobei der Cofaktor ständig enzymatisch regeneriert wird.

Fig. 1

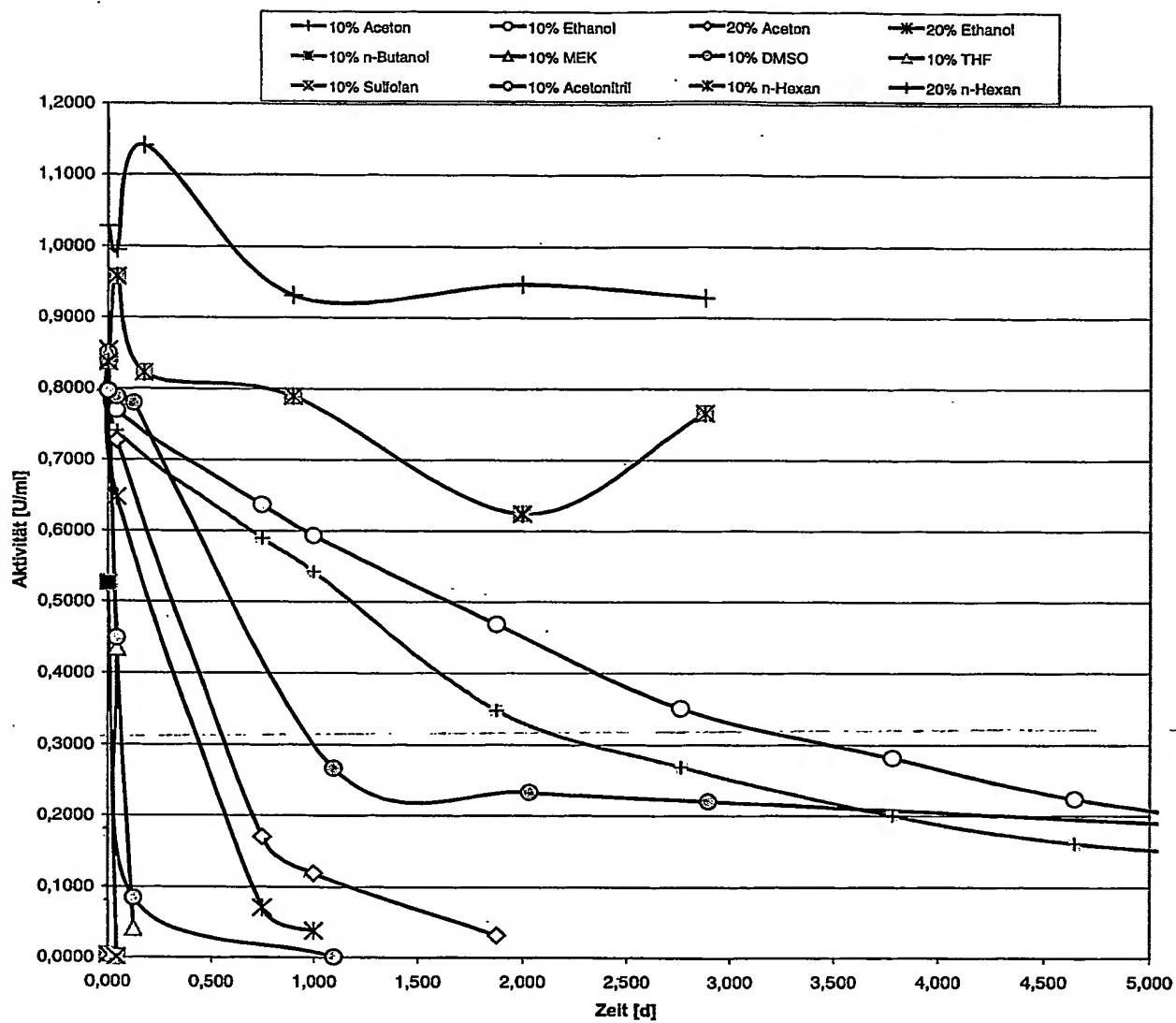


Fig 2:

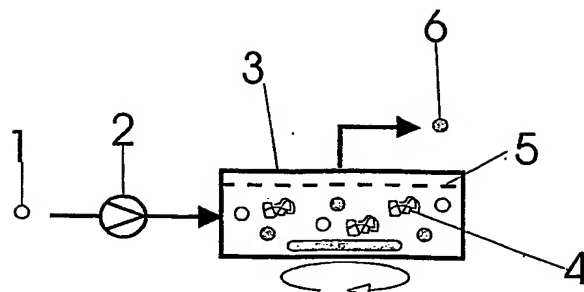


Fig. 3:

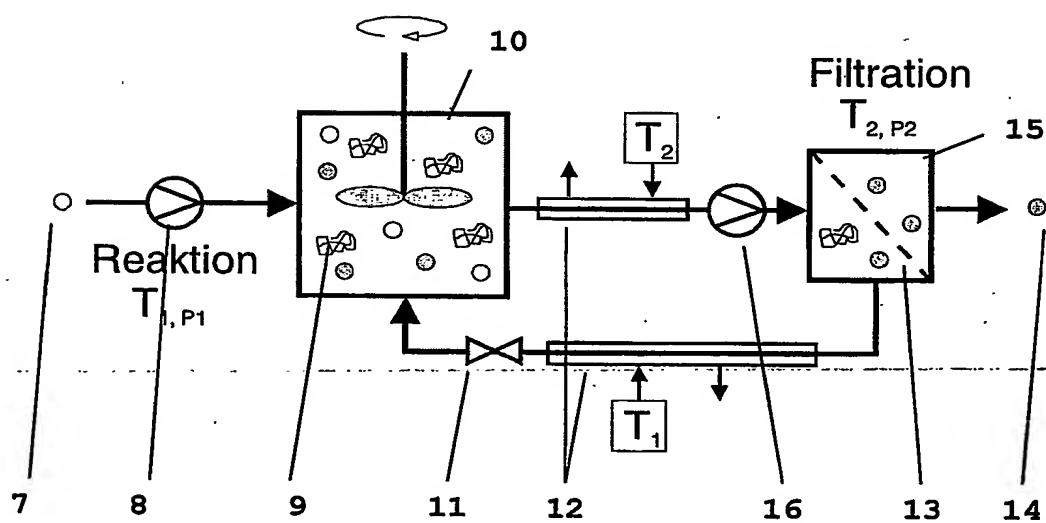
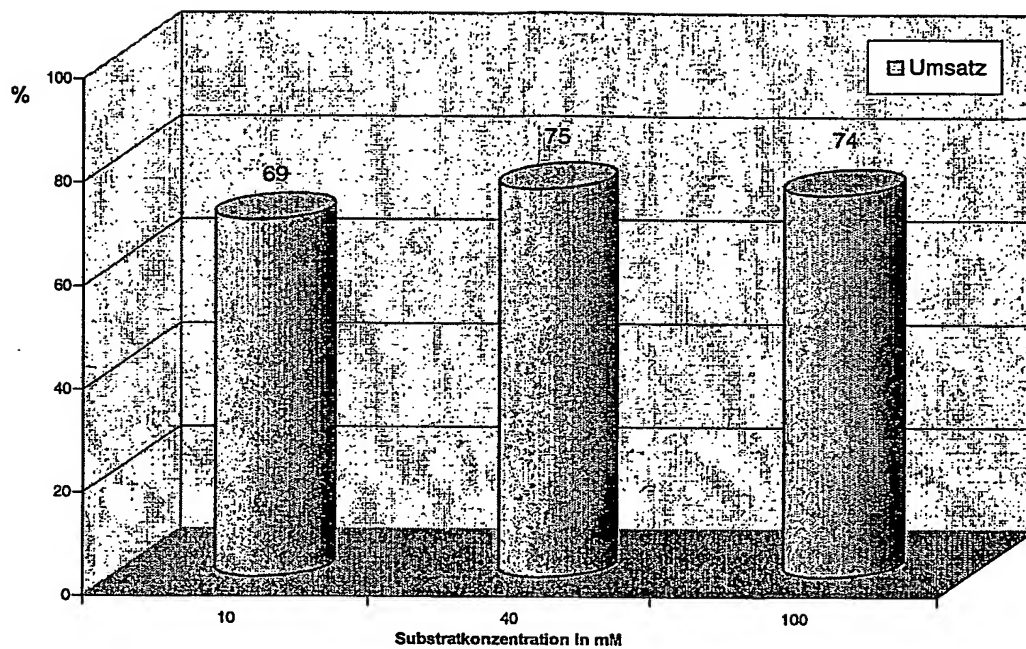




Fig. 4:



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**